doi 10.3969/j.issn.1673-4254.2016.04.05

J South Med Univ, 2016, 36(4): 472-476

基础研究

S期H1299细胞热损伤后的延迟性DNA双链断裂

孙 婷[1],丁为民[1],李 凌[2],张 彦[2]

[1]南方医科大学珠江医院肿瘤中心,广东 广州 510282;[2]南方医科大学公共卫生与热带医学学院三级生物安全实验室,广东 广州 510515

摘要:目的 研究S期细胞热损伤后DNA双链断裂形成规律,以阐明S期细胞热敏感原因,并分析DNA双链断裂延迟性形成的可能机制。**方法** 流式细胞术分析热损伤后细胞周期阻滞;EdU掺入实验检测DNA复制能力;血清饥饿法同步H1299细胞周期;中性彗星实验动态观察热损伤后DNA双链断裂形成;台盼蓝拒染实验研究热损伤后细胞存活率;蛋白免疫印记实验检测ATM磷酸化及DNA结合RAD18情况。**结果** 流式结果显示H1299细胞经45 ℃热损伤1 h后S期细胞较未加热组明显增多(P<0.01);热损伤后EdU阳性率随时间变化趋势同S期比例变化;S期细胞热损伤后需经37 ℃正常孵育一定时间方可观察到"彗星拖尾"现象,且随着正常孵育时间延长,反映DNA双链断裂的尾力矩值越大;台盼蓝拒染实验显示S期细胞受热后7.5 h内死亡率保持较低水平,之后细胞死亡加速;热损伤后ATM磷酸化先增多后减少,热损伤导致DNA结合RAD18明显减少。**结论** 细胞热损伤后可发生S期阻滞,阻滞期间因复制继续、DNA损伤修复抑制而延迟形成的致死性DNA双链断裂是S期细胞热敏感的可能原因。

关键词:H1299细胞;热损伤;细胞周期阻滞;DNA双链断裂

Delayed DNA double-strand break in S-phase H1299 cells after thermal damage

SUN Ting[1], DING Weimin[1], LI Ling[2], ZHANG Yan[2]

[1]Department of Neoplasm, Zhujiang Hospital, the South Medical University, Guangzhou 510282, China; [2]Biosafety Level-3 Laboratory, Guangdong Provincial Key Laboratory of Tropical Disease Research, School of Public Health and Tropical Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: Objective To study the pattern of DNA double-strand break (DSB) formation in S-phase cells after thermal damage and explore the mechanisms behind heat sensitivity of S-phase cells and delayed DSBs. **Methods** Flow cytometry was used to analyze the cell cycle arrest in H1299 cells exposed to thermal damage, and EdU incorporation assay was employed to evaluate the DNA replication capacity of the cells. The cells synchronized in S phase were obtained by serum starvation and DSBs were observed dynamically using neutral comet assay. Trypan blue dye exclusion technique was used to analyze the cell viability after thermal damage. Western blotting (WB) was used to detect the phosphorylation of ATM and DNA binding RAD18. **Results** The percentage of S-phase cells increased significantly after exposure of the cells to 45 ℃ for 1 h (P<0.01). The time-dependent variation pattern of EdU incorporation was similar to that of S-phase cell fraction. The comet tail began to appear only after incubation of the cells at 37 ℃ for some time and the Olive tail moment (OTM) increased with prolonged incubation. Cell death remained low until 7.5 h after heat exposure of the S-phase cells and then increased rapidly. The phosphorylation of ATM first increased but then decreased drastically. In cells with heat exposure, DNA binding RAD18 was attenuated obviously compared that in non-exposed cells. **Conclusion** Thermal damage causes cell cycle arrest in S phase, and delayed fatal DSBs occur in the arrested cells due to persistent replication and DNA damage repair suppression, which are the possible cause of heat sensitivity of S-phase cells.

Key words: H1299 cells; thermal damage; cell cycle arrest; DNA double-strand break

热疗用于肿瘤治疗由来已久,随着磁热疗技术的发展,热疗再次成为肿瘤治疗的研究热点。目前关于热疗基因水平的作用机制研究较多,有文献报道热处理可致S期阻滞及此期氧化碱基、无碱基位点、碱基脱氨基等DNA损伤形成[1]。近期较多关于热损伤后DNA双链断裂(DSB)形成的文献发表[2-6],但现有报道大多提示DSB主要发生在G1、G2期,S期无或极少产生DSB,这与S期热敏感现象矛盾。为探讨S期细胞热敏感原因,我们猜想S期细胞受热后发生碱基损伤并使损伤修复蛋白变性失活,当含碱基损伤的DNA继续指导复制时可延迟形成DSB,最终导致细胞死亡。因此本研究应用S期

收稿日期:2015-11-08

基金项目:国家自然科学基金(81272407);卫生部重大科技专项课题资助项目(W2009BX015)

Supported by National Natural Science Foundation of China (81272407).

作者简介:孙 婷,在读硕士研究生,E-mail: SUNTING512@sina.com

通信作者:丁为民,副教授,副主任医师,E-mail: dwm-2001@163.com

同步化细胞进行热处理后动态观察DSB形成,同时监测细胞周期、细胞死亡率以探讨S期热敏感原因,结合DNA复制、损伤修复蛋白结果分析DSB形成机制。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞及培养条件 非小细胞肺癌H1299细胞由美国北卡罗来纳教堂山分校病理学和实验医学实验室惠赠,并用含10%胎牛血清、1%双抗的DMEM完全培养基置于37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养。

1.1.2 主要试剂 DMEM培养基、胎牛血清、0.25%胰酶、D-Hanks液与双抗均购自美国Gibco,细胞周期检测试剂盒(KGA214)和RNase A购自凯基生物公司,锐博EdU检测试剂盒(C10310)、碧云天细胞核蛋白抽提试剂盒(P0027)均购自广州安邦生物科技有限公司,多聚甲醛(美国Sigma),低熔点琼脂糖(美国Amresco),正常熔点琼脂糖(西班牙Biowest),p-ATM (phospho S1981,英国abcam)抗体、RAD18抗体(美国CST)。

1.1.3 主要仪器 细胞培养箱(美国Thermo Fisher),流式细胞仪(guava easyCyte HT,美国Millipore),倒置荧光显微镜(日本OLYMPUS IX51),图像采集系统(日本OLYMPUS DP Controller),化学发光成像系统(中国Tanon)。

1.2 方法

1.2.1 细胞热损伤 取对数生长期细胞换为45 ℃预热的培养基后迅速放入45 ℃ 5% CO_2孵箱加热1 h(研究的预实验—平板克隆形成实验结果提示克隆形成率为50%左右的加热条件为45 ℃×1 h),热处理后换为37 ℃预热的培养基并根据实验目的放回37 ℃孵箱内继续培养0、2.5、5、7.5、10、12.5 h用于后续实验。

1.2.2 流式细胞术周期检测 将各组细胞用胰酶消化、离心收集细胞沉淀后参照周期检测试剂盒说明书操作:PBS清洗2遍再加入适量70%乙醇于4 ℃过夜固定;次日弃掉固定液并用PBS清洗,重悬细胞使浓度为1×10^5/mL,加入适量的RNase储备液37 ℃水浴30 min去除RNA后再加入PI染液常温避光染色30 min,上机检测,最后用Modifit软件分析检测结果。每组各3瓶细胞,实验重复3次。

1.2.3 EdU掺入实验 将96孔板中对数生长期细胞进行实验处理后参照EdU试剂盒说明书操作:每孔加入50 μL 50 μmoL的EdU培养基孵育2 h后用4%多聚甲醛固定,再每孔加入50 μL 1×Apollo染色反应液避光染色EdU,1×Hoechst33342反应液复染DNA。最后每孔随机选5个视野用荧光显微镜拍照、Image-Pro Plus6.0软件计数,EdU阳性率=复染细胞数/总细胞数。每组各设3个复孔。

1.2.4 血清饥饿法细胞周期同步 将对数生长期细胞用D-Hanks液清洗两遍后加入无血清DMEM进行饥饿培养,饥饿时间参考Akihisa Takahashi报道的28 h[6],然后恢复全培继续培养,每2 h随机取3皿细胞(汇合度<100%)采用流式细胞术检测周期并将检测结果绘制成周期图,将周期图中S期比例最高的时间点作为H1299细胞S期的同步条件。

1.2.5 中性彗星实验 参照Velichko,A.K.的实验步骤[2]并稍作调整:(1)铺胶:取150 μL正常熔点琼脂糖凝胶均匀铺于毛玻璃载玻片,置4 ℃固化,分别取30 μL各组细胞悬液与70 μL低熔点琼脂糖凝胶混匀后均匀铺于第1层凝胶上,4 ℃固化;(2)裂解和电泳:凝胶板置于新鲜配制的中性裂解液并于4 ℃裂解2 h;TE溶液漂洗去掉多余盐分,于4 ℃电泳液(TBE溶液,pH:8.2~8.5)中解旋30 min后电泳(25 V 30 min);(3)染色和观察:PI染色后荧光显微镜(×20)下观察并每个样本随机摄取3个视野。CASP软件分析各样本结果,Olive尾距(OTM)作为分析指标。实验重复3次。

1.2.6 蛋白免疫印记实验 按细胞核蛋白提取试剂盒操作步骤提取DNA结合蛋白并用BCA法测定蛋白浓度,各组细胞分别取50 μg蛋白用10% SDS-PAGE凝胶进行分离。完成电泳后利用半干转法将蛋自质转印至PVDF膜,将膜以脱脂奶粉封闭后转入p-ATM、RAD18蛋白抗体稀释液中4 ℃孵育过夜,然后用过氧化物酶偶联的二抗孵育2 h,最后经充分清洗后以ECL化学发光法显色曝光并采集图片。

1.2.7 台盼蓝拒染实验 将各组细胞悬液浓度调整为5×10^5/mL,分别吸出0.9 mL均匀细胞液,加0.1 mL 0.4%的台盼蓝混匀染色,3 min内计数,细胞变蓝者为死细胞,每瓶细胞计数3次,取均值。细胞死亡率=死细胞总数/(活细胞总数/死细胞总数)×100%。

1.3 统计学方法

实验数据用SPSS 20.0统计软件分析,两组间比较采用两独立样本t检验,检验水准$\alpha=0.05$,$P<0.05$为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 H1299细胞经45 ℃热损伤1 h后可致S期阻滞

热处理后动态观察加热组及对照组细胞的周期分布(图1)可看出:H1299细胞热损伤后随着37 ℃正常孵育时间延长,S期细胞逐渐增多并于7.5 h左右比例达到最高:(51.63±0.27)%;之后S期比例逐渐减小,提示阻滞解除。未加热组S期比例变化微小。正常孵育5、7.5、10 h加热组S期比例与对照组差异有统计学意义($P<0.01$)。

2.2 热损伤后细胞仍保持高DNA复制水平

为了验证45 ℃热损伤1 h后细胞复制是否停止,我

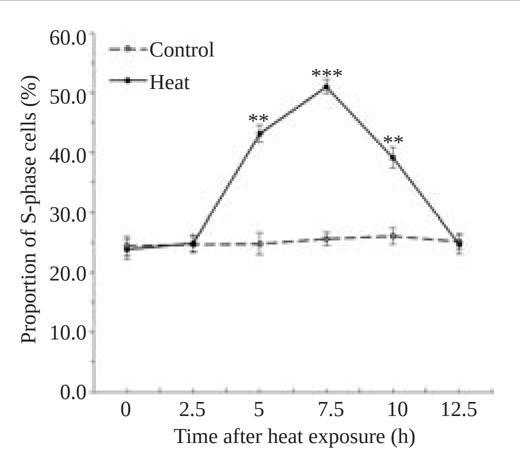


图1 H1299细胞热损伤(45 ℃×1 h)后加热组与对照组的S期比例对比

Fig.1 Proportion of S-phase cells in heat exposure group (45 ℃×1 h) and control group. Data are presented as *Mean*±*SD* from 3 independent experiments (**$P<0.01$, ***$P<0.001$).

们进行了EdU掺入实验。其结果(图2)与图1比较分析可知EdU阳性率与S期比例随时间变化的趋势相似:两者均以7.5 h为界先升后降。

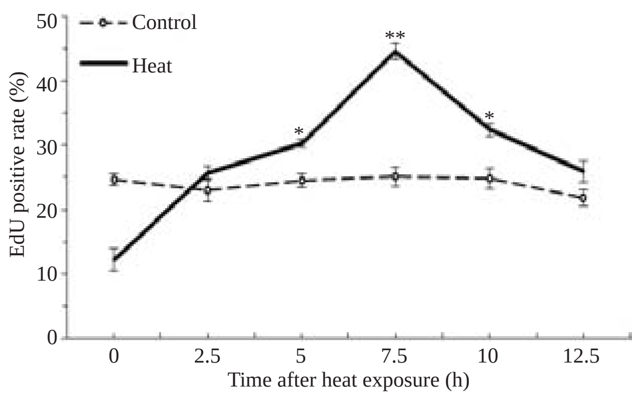


图2 H1299细胞热损伤(45 ℃×1 h)后加热组与对照组的EdU阳性率比较

Fig.2 Comparison of EdU positivity rate between heat exposure group (45 ℃×1 h) and control group. Data are presented as *Mean*±*SD* from 3 independent experiments (*$P<0.05$, **$P<0.01$).

2.3 血清饥饿法可有效使H1299细胞同步至S期

本实验采用血清饥饿法同步周期,根据其结果可知H1299细胞经血清饥饿培养28 h再恢复全培18 h可有效使细胞同步至S期,其比例可达(69.27±0.81)%;而未经饥饿的细胞S期持续在(27.24±1.75)%。

2.4 S期H1299细胞热损伤后延迟形成DSB

图3可看出S期H1299细胞热处理并恢复37 ℃培养0、2.5 h组细胞均未见明显的"彗星拖尾"现象,其OTM值与对照组亦无统计学差异(图4);正常培养5 h后开始出现明显的"慧尾",OTM值与对照组有统计学差异($P<0.05$)。将OTM值与细胞周期变化比较可知OTM值变化趋势同S期比例变化(图4)。

2.5 热损伤细胞于S期阻滞解除后迅速死亡

台盼蓝拒染实验结果(图5)显示S期H1299细胞热损伤后恢复正常培养7.5 h前H1299细胞死亡率保持较低水平,7.5 h后死亡细胞迅速增多。

2.6 热损伤后ATM磷酸化、DNA结合RAD18变化

未加热细胞无ATM磷酸化,加热组细胞ATM磷酸化水平逐渐增高直至恢复正常培养5 h达最多,之后磷酸化水平下降至消失;加热后DNA结合的RAD18较对照组显著减少(图6)。

3 讨论

热处理自用于肿瘤治疗以来常作为放、化疗的疗效"增敏剂"应用于临床[7],随着近几年磁流体热疗技术的发展,肿瘤热疗再次成为研究热点[8]。目前研究者认为热疗增强放疗疗效的机制之一是放疗抵抗的S期细胞对热损伤敏感,两者存在互补杀伤作用[9],但S期细胞热损伤敏感的机制尚不清楚。有研究报道热处理可致细胞S期阻滞[10],我们的研究亦发现H1299热损伤后S期比例逐渐升高,且DNA复制活性迅速恢复(图1、2)。Ghosal等[11]认为当DNA损伤存在时细胞将启动S期阻滞以修复损伤,ATM的S1981位点磷酸化为周期阻滞调节通路的重要环节。故我们研究了热损伤后ATM磷酸化情况,其结果也支持上述发现(图6),间接反应热损伤后细胞内形成了一定的碱基损伤,并进一步发生S期阻滞以利于损伤修复。

热疗增强放疗疗效的另一机制是热疗可抑制放疗形成的DSB损伤修复[12],但热疗本身可否形成DSB存在争议。Velichko报道热损伤后S期细胞仅产生DNA单链断裂(SSB),DSB主要来自非S期细胞[2]。一般情况下,含SSB的细胞尚不足以导致细胞死亡,但细胞一旦存在一个DSB未修复即可引起细胞死亡;故上述报道与S期热损伤敏感相矛盾。本研究动态观察S期H1299细胞热损伤后"彗星拖尾"现象并分析其尾力矩值,结果显示S期细胞热损伤后延迟形成DSB,且DSB形成与细胞死亡密切相关(图3、4、5),有文章报道热疗可促进细胞凋亡[13]。我们分析Velichko未观察到S期细胞DSB形成可能是由于其观察时间较短(热后立马检测)所致。因PCR技术即使涉及95 ℃高温也未发生DNA链断裂,结合目前的研究结果可以看出S期阻滞细胞内的DSB为间接产生。有研究证实热处理可直接导致DNA碱基脱氨基及碱基位点缺失等损伤[1],并有研究发现氧化应激等导致的碱基损伤可在S期继续指导复制而形成DSB[14]。综合分析前人关于细胞内DSB形成的观点及本研究的前述结果,我们推测S期细胞受热

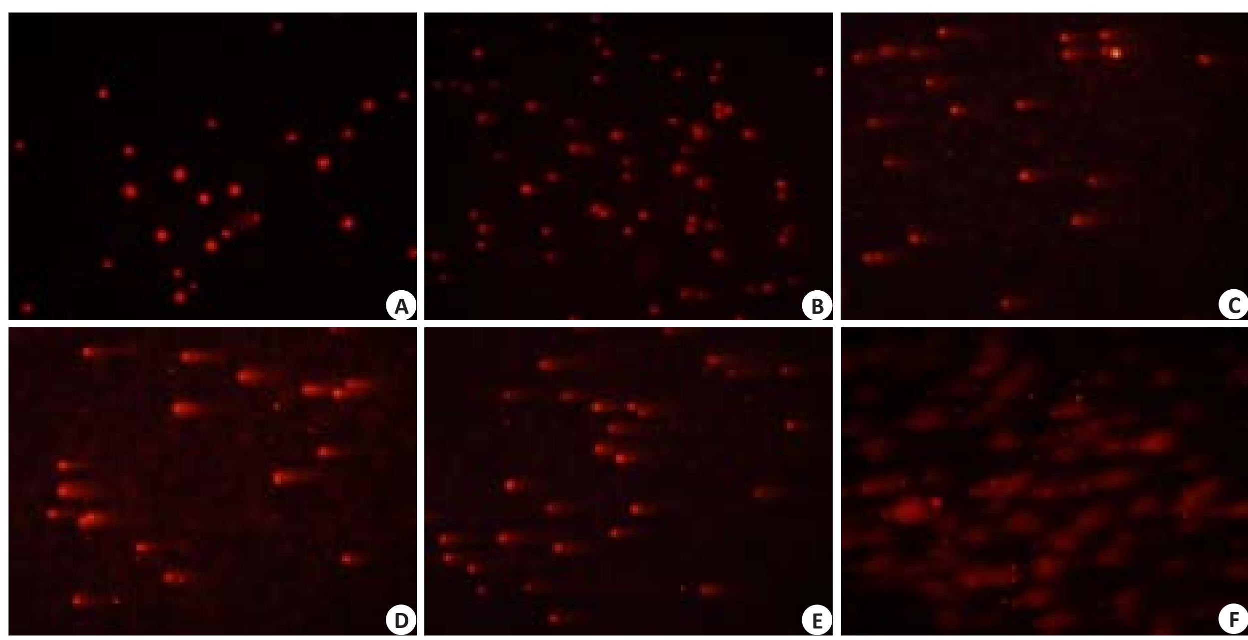


图3 S期H1299细胞热损伤后的彗星图像

Fig.3 Comet images of S-phase synchronized H1299 cells at different time points after thermal exposure (Original magnification: ×20). ***A***: 0 h; ***B***: 2.5 h; ***C***: 5 h; ***D***: 7.5 h; ***E***: 10 h; ***F***: 12.5 h .

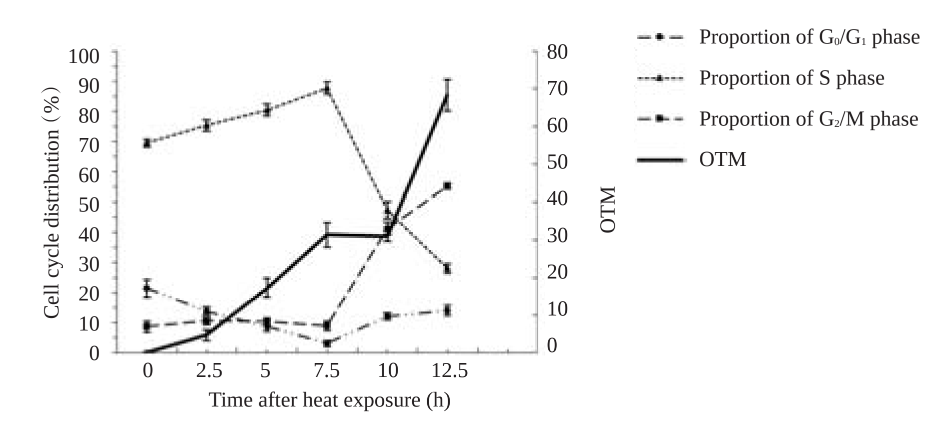


图4 S期H1299细胞热损伤(45 ℃×1 h)后尾力矩(OTM值)及细胞周期的变化趋势

Fig.4 Variation of Olive tail moment and cell cycle distribution in S-phase synchronized H1299 cells after heat exposure. Data are presented as *Mean*±*SD* from 3 independent experiments.

后DSB形成的机制为:DNA复制遭遇未及时修复的碱基损伤,复制叉无法继续前行而崩溃,进而形成DSB。故我们利用蛋白免疫印记实验对多个DNA损伤修复相关蛋白表达进行分析,研究结果首次证明热处理可抑制DNA跨损伤修复:热处理后跨损伤修复蛋白RAD18与DNA结合长时间受到抑制(图6),而RAD18所主导的跨损伤修复通路对于修复复制叉所遭遇的DNA损伤极为重要[15]。此结果支持我们关于DSB形成的猜想。

综上所述,本研究证实了S期细胞热损伤后可产生DSB,但具有延迟性特点;DSB形成的可能机制为:热损伤后DNA复制受影响较小或恢复迅速,而DNA跨损伤修复长时间受到抑制,导致复制叉遭遇不能及时修复的损伤而崩溃,然后间接形成DSB,最终导致细胞死亡。本研究丰富了肿瘤热疗可能作用机制的理论基础,使热疗有望单独应用于临床,但其详细机制有待进一步研究。

参考文献:

[1] Takahashi TO. What is the critical hyperthermia target in cancer cells[J]. J Hyperthermic Oncol, 2006, 22(7): 229-37.

[2] Velichko AK, Petrova NV, Kantidze OL. Dual effect of heat shock on DNA replication and genome integrity[J]. Mol Biol Cell, 2012, 23(17): 3450-60.

[3] 李 明, 张保国. 热休克预处理对高温致中国仓鼠肺细胞(V79)细胞DNA双链断裂的影响[J]. 肿瘤防治研究, 2012, 39(1): 6-8.

[4] Roti JL. Cellular responses to hyperthermia (40-46 degrees C): Cell killing and molecular events[J]. Intern Hyperth, 2008, 24(1): 3-15.

[5] Takahashi A, Mori E, Somakos GI, et al. Heat induces gamma

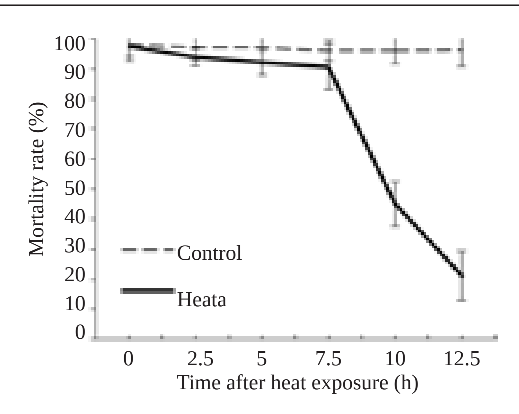


图5 台盼蓝拒染实验检测热处理(45 ℃×1 h)对S期H1299细胞死亡率的影响

Fig.5 Effect of heat exposure (45 ℃ × 1 h) on cell viability of S-phase synchronized H1299 cells measured by Trypan blue dye exclusion assay. Data are presented as *Mean* ± *SD* from 3 independent experiments.

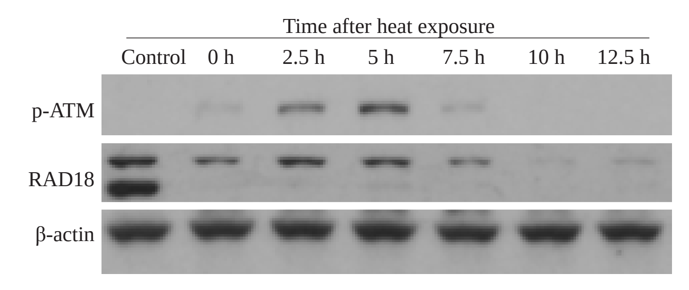


图6 热损伤(45 ℃×1 h)后ATM磷酸化、DNA结合RAD18的变化

Fig.6 Changes of ATM phosphorylation and DNA binding RAD18 in cells after heat exposure (45 ℃×1 h).

H2AX foci formation in mammalian cells[J]. Mutat Res, 2008, 656 (1/2): 88-92.

[6] Takahashi A, Matsumoto H, Nagayama K, et al. Evidence for the involvement of double-strand breaks in heat-induced cell killing[J]. Cancer Res, 2004, 64(24): 8839-45.

[7] Szasz A. Current status of oncothermia therapy for lung cancer[J]. Korean J Thorac Cardiovasc Surg, 2014, 47(2): 77-93.

[8] Kim KS, Lee SY. Nanoparticle-mediated radiofrequency capacitive hyperthermia: A phantom study with magnetic resonance thermometry[J]. Int J Hyperthermia, 2015 , 31(8): 831-9.

[9] Kaur P, Hurwitz MD, Krishnan S, et al. Combined hyperthermia and radiotherapy for the treatment of cancer[J]. Cancers (Basel), 2011, 3 (4): 3799-823.

[10] Velichko AK, Petrova NV, Razin SV. Mechanism of heat stress-induced cellular senescence elucidates the exclusive vulnerability of early S-phase cells to mild genotoxic stress[J]. Nucleic Acids Res, 2015, 43(13): 6309-20.

[11] Ghosal G, Chen JJ. DNA damage tolerance: a double-edged sword guarding the genome[J]. Transl Cancer Res, 2013, 2(3): 107-29.

12] Genet SC, Fujii Y, Maeda J, et al. Hyperthermia inhibits homologous recombination repair and sensitizes cells to ionizing radiation in a time- and temperature-dependent manner[J]. J Cell Physiol, 2013, 228(7): 1473-81.

[13] 高 琨, 方绳权, 张彩红, 等. 同步热放化疗对宫颈癌组织Bax、Bcl-2、P53蛋白表达的影响[J]. 南方医科大学学报, 2009, 29(12): 2537-9.

[14] Fridlich R, Annamalai D, Roy R, et al. BRCA1 and BRCA2 protect against oxidative DNA damage converted into double-strand breaks during DNA replication[J]. DNA Repair (Amst), 2015, 30(9): 11-20.

[15] Sasatani M, Xu Y, Kawai H, et al. RAD18 activates the G2/M checkpoint through DNA damage signaling to maintain genome integrity after ionizing radiation exposure[J]. PLoS One, 2015, 10 (2): e117845.

(编辑:孙昌朋)